

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 407 259 A1**

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 90401794.4

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 15/62, C12N 1/21,  
C12N 15/70, G01N 33/53**

(22) Date de dépôt: 25.06.90

Le demandeur a présenté une déclaration conformément à la règle 28 (4) CBE (remise d'un échantillon uniquement à un expert).  
Numéro(s) d'ordre de(s) dépôt(s): CNCM I-954, CNCM I-862.

(30) Priorité: 26.06.89 FR 8908444

(43) Date de publication de la demande:  
09.01.91 Bulletin 91/02

(84) Etats contractants désignés:  
AT CH DE FR GB IT LI SE

(71) Demandeur: **COMMISSARIAT A L'ENERGIE  
ATOMIQUE** Etablissement de Caractère  
Scientifique Technique et Industriel  
31/33, rue de la Fédération  
F-75015 Paris(FR)

(72) Inventeur: **Boquet, Paul**  
77 Chemin de Montral à la Montagne  
F-78160 Marly le Roi(FR)  
Inventeur: **Boulain, Jean-Claude**  
258 rue de Paris  
F-91120 Palaiseau(FR)  
Inventeur: **Ducancel, Frédéric**  
56 Boulevard de Reully  
F-75012 Paris(FR)  
Inventeur: **Gillet, Daniel**  
154 rue de Belleville  
F-75020 Paris(FR)  
Inventeur: **Menez, André**  
109 avenue Claude Nicolas Ledoux Magny  
les Hameaux  
F-78470 St Remy les Cheuvreuse(FR)

(74) Mandataire: **Orès, Bernard et al**  
Cabinet ORES 6, Avenue de Messine  
F-75008 Paris(FR)

(54) **Protéines hybrides entre une enzyme extracytoplasmique et au moins une autre protéine, leur procédé de préparation, ainsi que leurs applications.**

(57) Protéines hybrides entre un fragment d'une protéine P1 extracytoplasmique, une protéine P2 et une enzyme extracytoplasmique, la protéine P2 étant notamment un antigène ou un fragment variable (Fv) simple chaîne d'un anticorps, leur procédé de préparation, ainsi que leurs applications notamment comme agent de diagnostic, et dans le criblage d'une banque d'acide nucléique ou dans la sélection de clones recombinants.

Séquences d'ADN codant pour lesdites protéines hybrides, vecteurs d'expression contenant lesdites séquences, souches de bactéries ou de levures transformées par lesdits vecteurs ainsi que leur application pour la production et la sécrétion desdites protéines hybrides.

Ladite protéine hybride comprend notamment successivement un fragment d'une protéine P1 exportée ou sécrétée par un microorganisme notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une protéine P2 appropriée ou un fragment de celle-ci et au moins un fragment fonctionnel d'une enzyme appropriée, et possède à la fois les propriétés de l'enzyme et certaines propriétés de la protéine P2, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un anticorps, un antigène ou un récepteur.

EP 0 407 259 A1

**PROTEINES HYBRIDES ENTRE UNE ENZYME EXTRACYTOPLASMIQUE ET AU MOINS UNE AUTRE PROTEINE, LEUR PROCEDE DE PREPARATION, AINSI QUE LEURS APPLICATIONS.**

La présente invention est relative à des protéines hybrides entre un fragment d'une protéine P1 extracytoplasmique, une protéine P2 et une enzyme extracytoplasmique, la protéine P2 étant notamment un antigène ou un fragment variable (Fv) simple chaîne d'un anticorps, à leur procédé de préparation, ainsi qu'à leurs applications notamment comme agent de diagnostic, et dans le criblage d'une banque d'acide nucléique ou dans la sélection de clones recombinants.

La présente invention est également relative aux séquences d'ADN codant pour lesdites protéines hybrides, à des vecteurs d'expression contenant lesdites séquences, à des souches de bactéries ou de levures transformées par lesdits vecteurs ainsi qu'à leur application pour la production et la sécrétion desdites protéines hybrides.

Dans la littérature, un certain nombre de protéines hybrides ont été décrites ainsi que leur procédé de production.

On peut citer notamment les Brevets américains 4 411 994 et 4 338 397, qui décrivent l'utilisation du gène de la pénicillinase dans le plasmide pBR322 pour produire des protéines de fusion, qui sont transportées dans l'espace périplasmique par la séquence "leader" de la pénicillinase, en utilisant des séquences d'ADNc codant pour la préproinsuline, insérées au niveau du site PstI du plasmide pBR322.

On peut citer également la Demande de Brevet européen 196 864, qui décrit l'utilisation de la séquence "leader" de la phosphatase alcaline, suivie en aval et en phase de lecture, par la séquence codante pour la protéine désirée.

Le système d'expression de ladite séquence inclut un promoteur approprié (par exemple le promoteur du gène phoA), lié de manière opérationnelle à ladite séquence codante hybride et en aval de ladite séquence, un terminateur approprié, notamment le terminateur phoA.

Cette Demande de Brevet européen 196 864 fait apparaître que seules les protéines dites sensibles peuvent être fusionnées à la partie N terminale de la phosphatase alcaline et exportées ; Il est, de plus, précisé qu'une protéine est considérée comme sensible lorsqu'elle comporte une séquence en amino-acides qui interagit avec la séquence leader de la phosphatase alcaline et donne lieu à la sécrétion de ladite séquence.

Il est également précisé que la sensibilité de la protéine, sans doute due à la nature de sa séquence en amino-acides qui permet cette coopération entre les deux séquences, n'est pas comprise actuellement. Il est toutefois clair que certaines protéines hétérologues sont capables d'interagir avec la séquence signal dérivée d'un certain nombre de "leader" bactériens, alors que d'autres protéines sont incapables de cette interaction.

Cette Demande européenne décrit plus particulièrement, comme protéines sensibles, l'hGH et le TNF, alors que l'IL-2 est considérée comme une protéine non sensible, c'est-à-dire non exportée. Les protéines hybrides décrites dans cette Demande, sont destinées à produire notamment de l'hGH ou du TNF en quantités industrielles, par un procédé de recombinaison génétique, la séquence signal de la phosphatase alcaline servant uniquement au transport de la protéine étrangère.

La Demande de Brevet européen 242 243 décrit une protéine hybride comprenant une enzyme contenant un épitope, inséré de telle sorte dans la chaîne peptidique de l'enzyme, que l'épitope est exposé de manière à ce que lorsque la protéine hybride est en contact immunologique avec des anticorps dirigés contre l'épitope, un complexe est formé entre ladite protéine hybride et lesdits anticorps et l'activité enzymatique de ladite enzyme est pré servée soit dans l'état non complexé, soit dans l'état complexé. La protéine hybride décrite dans cette Demande européenne est repliée dans la membrane externe d'une bactérie, de telle sorte que l'épitope choisi soit exposé à la surface de la bactérie ; des souches de *E. Coli* portant à leur surface externe des récepteurs modifiés du phage lambda contenant, exposées à la surface, les protéines hybrides ci-dessus définies sont également décrites dans cette Demande. Les protéines hybrides décrites dans cette Demande, peuvent éventuellement comprendre la phosphatase alcaline, la peroxydase ou la  $\beta$ -galactosidase.

Il existe d'autres documents qui décrivent des protéines de fusion permettant d'obtenir le produit recherché, sécrété ou exporté. On peut citer en particulier l'article au nom de T.P. HOPP et al., paru dans *Biotechnol.*, 1988, 6, 1204-1210, qui décrit une séquence de fusion N-terminale courte utilisée comme marqueur pour l'identification et la purification de protéines recombinantes ; l'élimination dudit marqueur a l'avantage de ne pas nécessiter de traitements drastiques de la protéine de fusion. Il faut noter que, dans cet article T.P. HOPP et al., précisent que la réalisation de protéines de fusion présente, à l'heure actuelle, un certain nombre d'inconvénients ; en effet, il n'est pas évident d'obtenir des protéines de fusion qui

présentent une structure quaternaire qui correspond à celle de la protéine native, qui soient stables et qui conservent l'activité biologique de cette dernière ; on peut également citer l'article paru dans *Biochemical and Biophysical Research*, 1987, 149, 2, 607-614, qui décrit une protéine hybride qui comprend successivement la proinsuline ou un fragment de celle-ci et la phosphatase alcaline et est obtenue à partir d'un ADN

5 comprenant successivement le gène de la proinsuline et le gène de la phosphatase alcaline (liaison par l'extrémité 5' du gène codant pour la phoA mature).

Toutefois, les descriptions de protéines fusionnées et/ou exportées décrites dans la littérature ne s'appliquent qu'à des cas particuliers et ne peuvent être généralisables.

La Demanderesse s'est, en conséquence, donné pour but de pourvoir à une famille de protéines

10 hybrides directement exportées dans l'espace périplasmique ou sécrétées en dehors de la cellule sous leurs formes hybrides et constituées par un fragment d'une protéine P1, une protéine P2 et une enzyme, lesdites protéines hybrides conservant les propriétés de la protéine P2 et de l'enzyme et pouvant être utilisées comme réactif de diagnostic et/ou de dépistage dans le cadre de dosages de type RA (receptor assay) ou EIA (enzyme immunoassay), en particulier de type ELISA et pour la sélection de clones

15 recombinants ou pour le criblage d'une banque d'ADN ; de telles protéines hybrides répondent mieux aux nécessités de la pratique que les protéines hybrides de l'Art antérieur, notamment en ce que lesdites protéines hybrides exportées ou sécrétées sont directement utilisables comme réactif de diagnostic, sans étape de purification et sont stables.

De plus, de telles protéines hybrides permettent notamment le dosage de petites molécules, qui

20 habituellement, même si elles peuvent être couplées chimiquement à une enzyme, ne peuvent pas trouver application comme réactif et qui sont, jusqu'à présent, essentiellement dosées par RIA.

C'est également un but de l'invention de fournir les outils pour la production desdites protéines hybrides.

La présente invention a pour objet une séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est

25 constituée par une séquence hybride comprenant successivement la séquence leader du gène de structure d'une protéine appropriée P1 exportée ou sécrétée par un microorganisme, notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une séquence d'acide nucléique codant pour un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite protéine P1 mature, une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine P2, puis un fragment codant pour au moins un fragment fonctionnel de la séquence mature d'une

30 enzyme appropriée, l'ensemble de ces fragments étant en phase de lecture et codant pour une protéine hybride présentant à la fois les propriétés de l'enzyme et certaines propriétés de ladite protéine P2, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un anticorps, un antigène ou un récepteur.

On entend, au sens de la présente invention, par acide nucléique, aussi bien une séquence d'acide nucléique simple brin que double brin, l'acide nucléique étant aussi bien un ADN qu'un ARN.

35 Selon un autre mode de réalisation avantageux de la séquence conforme à l'invention, l'enzyme est choisie dans le groupe qui comprend notamment la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la glucose phosphatase acide, la phosphodiesterase cyclique et la  $\beta$ -lactamase.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la séquence conforme à l'invention, le fragment de séquence codant pour la protéine P2 est notamment choisi dans le groupe qui comprend les séquences

40 codant pour les hormones peptidiques, les séquences codant pour une toxine et les séquences codant pour un fragment simple chaîne analogue aux domaines variables des immunoglobulines (immunoglobulines recombinantes).

Ces derniers fragments sont notamment décrits dans *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5879-5883.

Selon une disposition de ce mode de réalisation, la toxine est avantageusement une neurotoxine.

45 Conformément à l'invention, la protéine P1 est identique à ou différente de l'enzyme définie ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la séquence conforme à l'invention, ladite séquence d'acide nucléique est constituée par une séquence hybride comprenant successivement le fragment leader du gène de structure d'une enzyme exportée ou sécrétée par un microorganisme, notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une séquence d'acide nucléique codant pour un

50 fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite enzyme mature, une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine P2, puis un fragment codant pour au moins un fragment fonctionnel de la séquence mature de ladite enzyme, l'ensemble de ces fragments étant en phase de lecture et codant pour une protéine hybride présentant à la fois les propriétés de l'enzyme et certaines propriétés de ladite protéine, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un anticorps, un antigène ou un récepteur.

55 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite séquence hybride comprend successivement la séquence leader du gène de structure de la phosphatase alcaline, un fragment codant pour, au plus, les 28 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline mature, une séquence d'ADN codant pour une protéine P2 ou un fragment de celle-ci, puis un fragment codant pour, au moins, les 422

5 récepteur.

10 phosphatase alcaline.

Conformément à cette modalité, la séquence codant pour l'érabutoxine a comprend 192 paires de bases et deux sites de restriction Sau 3 AI supplémentaires.

Ladite séquence hybride comprend la séquence n° 1 ci-après :

[illegible]

CAG ACT-fragment codant pour au moins les 422 acides aminés restants C-terminaux de la phosphatase alcaline, et est dénommée ea/phoA28.

35 correspond à la fin dudit insert.

La séquence complète du gène de structure de la phosphatase alcaline (gène *phoA*) est décrite dans GENE, 1986, 44, 121-125.

40 tase alcaline, un fragment codant pour les 6 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline mature, une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine P2 ou un fragment de celle-ci, puis un fragment codant pour les 444 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline, laquelle séquence comprend en outre, notamment pour la mise en phase de lecture de l'ensemble de ces fragments, en aval et/ou en amont du fragment codant pour la protéine P2, un fragment d'acide nucléique approprié, laquelle  
45 séquence hybride, en phase de lecture, code pour une protéine hybride présentant à la fois les propriétés de la phosphatase alcaline et certaines des propriétés de la protéine différente de l'enzyme, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un antigène, un anticorps ou un récepteur.

50 mature est notamment préparée grâce à l'insertion d'au moins un site de restriction unique dans la séquence codant pour la phosphatase alcaline, déphasant le cadre de lecture du gène de la *phoA* et empêchant l'expression de la phosphatase alcaline, alors que l'insertion de la protéine P2 au niveau dudit site, permet, dans les conditions de l'invention, le rephasage du gène de la phosphatase alcaline et l'expression de cette dernière.

55 Selon une modalité avantageuse de cette disposition, ladite séquence d'ADN hybride comprend successivement la séquence leader du gène de structure de la phosphatase alcaline, la séquence codant pour les 6 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline, la séquence d'acide nucléique codant pour l'angiotensine I, un fragment comprenant la séquence AGG G et qui permet de rephaser le gène de la

phosphatase alcaline, puis un fragment codant pour, au moins, les 444 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline.

Ladite séquence hybride comprend la séquence n° 2 ci-après :

```

5      -21
      GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG GCA CTC TTA CCG TTA CTG
      Met lys gln ser thr ile ala leu ala leu leu pro leu leu

10      TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA CCA GAA ATG ccc GAT
      phe thr pro val thr lys ala arg thr pro glu met pro asp

15      CGT GTC TAT ATT CAC CCG TTT CAC CTT Agg gTT CTG GAA AAC
      arg val tyr ile his pro phe his leu arg val leu glu asn

      CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC
      arg ala ala gln gly asp ile thr ala pro gly gly ala arg

20      CGT TTA ACG ...
      arg leu thr ...

      .
      .
25      .      +450
      ... CTG AAA TAA
      ... leu lys stop

```

Cette séquence n° 2 est dénommée Angio/phoA6.

Dans cette séquence n° 2, la numérotation négative correspond aux acides aminés du peptide signal de la phosphatase alcaline et la numérotation positive correspond aux acides aminés de la phosphatase alcaline mature. La séquence soulignée est celle de l'angiotensine I. L'arginine précédant la valine +7 a été introduite par les nécessités du clonage et la remise en phase du gène de la phoA. Les nucléotides, correspondant au site de restriction unique défini ci-dessus introduit dans le gène de la phosphatase, sont indiqués en lettres minuscules ; il s'agit dans le cas présent d'un site SmaI (ccc.....ggg). Cela permet de mettre en évidence le déphasage du gène phoA entraîné par la présence dudit site et le rephasage apporté par l'introduction de la séquence de l'angiotensine. La portion de séquence de la phosphatase non représentée (pointillés) correspond à celle publiée par CHANG et al. (CHANG, C.N., W.-J. KUANG, and E.Y. CHEN, 1986, Gene, 44:121-125).

Selon une autre modalité avantageuse de cette disposition, ladite séquence d'ADN hybride comprend successivement la séquence leader du gène de structure de la phosphatase alcaline, la séquence codant pour les 6 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline, un fragment comprenant la séquence GAT CCC, la séquence d'acide nucléique codant pour l'éributoxine a, un fragment comprenant la séquence GAT C, lequel fragment permet de rephaser le gène de la phosphatase alcaline, puis un fragment codant pour, au moins, les 444 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline.

Ladite séquence hybride comprend la séquence n° 3 ci-après :

50

55

```

-21
GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG GCA CTC TTA CCG TTA CTG
Met lys gln ser thr ile ala leu ala leu leu pro leu leu
5

          -1 +1
TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA CCA GAA ATG ccc GAT
phe thr pro val thr lys ala arg thr pro glu met pro asp
10
CCC AGG ATA TGT TTT AAC CAT CAG TCA TCG CAA CCG CAA ACC
pro arg ile cys phe asn his gln ser ser gln pro gln thr
ACT AAA ACT TGT TCA CCT GGG GAG AGC TCT TGC TAT AAC AAG
thr lys thr cys ser pro gly glu ser ser cys tyr asn lys
15
CAA TGG AGC GAT TTC CGT GGA ACT ATA ATT GAA AGG GGA TGT
gln trp ser asp phe arg gly thr ile ile glu arg gly cys
GGT TGC CCC ACA GTG AAG CCC GGT ATT AAA CTC AGT TGT TGC
20
gly cys pro thr val lys pro gly ile lys leu ser cys cys

          +7
GAA TCA GAG GTC TGC AAC AAT GAT Cgg gTT CTG GAA AAC CGG
glu ser glu val cys asn asn asp arg val leu glu asn arg
25
GCT GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC CGT
ala ala gln gly asp ile thr ala pro gly gly ala arg arg
TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC ...
30
leu thr gly asp gln thr ala ...
.
.
.
          +450
... CTG AAA TAA
35
... leu lys stop

```

Cette séquence n° 3 est dénommée ea/phoA6.

Dans cette séquence n° 3, la numérotation négative correspond aux acides aminés du peptide signal de la phosphatase alcaline et la numérotation positive correspond aux acides aminés de la phosphatase alcaline mature. La séquence soulignée est celle de l'érabutoxine a. Les acides aminés Asp-Pro et Asp-Arg de part et d'autre de la séquence de l'érabutoxine ont été introduits par les nécessités du clonage et la remise en phase du gène de la phoA. Les nucléotides correspondant au site de restriction *smal* introduit dans le gène de la phosphatase sont indiqués en lettres minuscules (ccc.....ggg). Cela permet de mettre en évidence le déphasage du gène *phoA*, entraîné par la présence dudit site et le rephasage apporté par l'introduction de la séquence de l'érabutoxine. La portion de séquence de la phosphatase non représentée (pointillés) correspond à celle publiée par CHANG et al. (CHANG, C.N., W.-J. KUANG, and E.Y. CHEN, 1986, Gene 44:121-125).

La présente invention a également pour objet une protéine, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence hybride comprenant successivement un fragment d'une protéine P1 exportée ou sécrétée par un microorganisme notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une protéine P2 appropriée ou un fragment de celle-ci et au moins un fragment fonctionnel d'une enzyme appropriée, ladite protéine hybride possédant à la fois les propriétés de l'enzyme et certaines propriétés de la protéine P2, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un anticorps, un antigène ou un récepteur.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine hybride, la protéine P1 est différente de l'enzyme.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite protéine hybride, la protéine P1 est identique à l'enzyme.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite protéine hybride comprend une



enzyme exportée ou sécrétée par un microorganisme notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, dans laquelle est insérée une protéine P2 appropriée.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite protéine hybride comprend successivement un fragment d'une enzyme exportée ou sécrétée par un microorganisme notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une protéine P2 appropriée, puis la séquence mature complète de ladite enzyme.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la protéine hybride conforme à l'invention, elle contient une protéine P2 notamment choisie dans le groupe qui comprend les hormones peptidiques, les fragments simple chaîne analogues aux fragments variables des immunoglobulines et les toxines, insérée au sein d'une enzyme choisie dans le groupe qui comprend notamment la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la glucose phosphatase acide, la phosphodiesterase cyclique et la  $\beta$ -lactamase.

Selon une disposition de ce mode de réalisation, ladite protéine hybride comprend avantageusement une neurotoxine insérée dans la phosphatase alcaline.

Selon une modalité avantageuse de cette disposition, la neurotoxine est l'érabutoxine a (ea), laquelle protéine hybride présente la séquence déduite selon les formules I ou III ci-dessus.

Selon une autre disposition de ce mode de réalisation, ladite protéine hybride comprend avantageusement l'angiotensine I insérée dans la phosphatase alcaline et présente la séquence déduite selon la formule II ci-dessus.

La présente invention a notamment l'avantage d'exprimer, de manière inattendue, à la fois une enzyme et une protéine fonctionnelle P2, qu'elle soit insérée au sein de l'enzyme ou prise en sandwich entre une protéine P1 et ladite enzyme et de présenter une grande stabilité. Elle a également l'avantage d'exprimer une protéine fonctionnelle de petite taille qui, jusqu'à présent, même si elle pouvait être couplée chimiquement avec une enzyme, ne pouvait pas trouver application comme réactif et ne pouvait, en conséquence pas être utilisée dans des dosages de type EIA ou ELISA, mais uniquement dans des dosages de type RIA, beaucoup plus lourds à mettre en oeuvre.

La présente invention a également pour objet une famille de vecteurs d'expression et/ou de clonage d'une protéine hybride conforme à l'invention, caractérisée en ce que chaque vecteur inclut un système d'expression comprenant :

- un promoteur approprié,
- un site de fixation aux ribosomes,
- une séquence d'acide nucléique comportant la séquence leader du gène de structure d'une protéine P1, une séquence codant pour un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite protéine P1 mature, une séquence codant pour une protéine P2 insérée au niveau d'un site de restriction naturel et la séquence codant pour une enzyme extracytoplasmique mature ou un fragment de celle-ci, laquelle séquence d'acide nucléique correspond à une séquence hybride conforme à l'invention, et

- un terminateur de transcription, lequel système d'expression est inséré dans une structure génétique appropriée, notamment choisie dans le groupe qui comprend des plasmides, des phages, des cosmides ou des chromosomes appropriés.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, la structure génétique est un plasmide et la protéine P1 est identique à l'enzyme.

Selon une disposition avantageuse de ce vecteur, on obtient, lorsque P2 est avantageusement l'érabutoxine a, un plasmide présentant les propriétés suivantes :

- il comprend 6,1 kb ;
- il est obtenu par ligation du plasmide pJC2431 portant le gène de structure de la phosphatase alcaline et le gène de résistance à l'ampicilline (AP<sup>R</sup>), ledit plasmide étant linéarisé au site Bcl I, au niveau du codon 28 dudit gène de structure de la phosphatase alcaline, -avec le fragment Sau 3AI-Sau 3AI de 192 paires de bases codant pour l'érabutoxine a.

Ce plasmide a été dénommé pEP1726 par les Inventeurs.

Le plasmide pJC2431 est décrit dans l'article de JC. LAZZARONI et al., paru dans J. Bacteriol., 1985, 164, 1376-1380.

La présente invention a également pour objet une autre famille de vecteurs d'expression et/ou de clonage d'une protéine hybride conforme à l'invention, caractérisée en ce que chaque vecteur inclut un système d'expression comprenant :

- un promoteur approprié,
- un site de fixation aux ribosomes,
- une séquence d'acide nucléique comportant la séquence leader du gène de structure d'une protéine P1, une séquence codant pour un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite protéine P1 mature, la séquence codant pour une enzyme extracytoplasmique mature ou un fragment de celle-ci et un ou plusieurs sites de

restriction uniques, aptes à recevoir une séquence codant pour une protéine P2, situés à la jonction entre le fragment de séquence codant pour la protéine P1 et la séquence codant pour l'enzyme, et

- un terminateur de transcription,

lequel système d'expression est inséré dans une structure génétique appropriée, notamment choisi dans le groupe qui comprend des plasmides, des phages, des cosmides ou des chromosomes appropriés.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, au moins l'un des sites de restriction uniques introduit entraîne un déphasage du gène de l'enzyme, le rephasage dudit gène étant assuré par l'introduction de la séquence de la protéine P2.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, on obtient un plasmide présentant les propriétés suivantes :

- il comprend environ 5,9 kb, et

- il est obtenu par mutagénèse dirigée du gène *phoA* porté par le plasmide pJC2431 de manière à introduire un site de restriction unique *SmaI*, correspondant à la position +6 de la protéine mature.

Un tel plasmide a été dénommé pLIP1 par les Inventeurs et est dit non chargé.

Lorsque la séquence codant pour la protéine P2 est insérée au niveau d'un site de restriction naturellement présent dans le gène de structure de la *phoA*, ou lorsque la séquence codant pour la protéine P2 est insérée au niveau d'un site de restriction unique, préalablement introduit dans le gène de structure de la *phoA*, de tels vecteurs contiennent des séquences hybrides conformes à l'invention et expriment directement la protéine hybride quand ils sont présents dans un microorganisme approprié ; de tels vecteurs sont dits chargés, alors que le vecteur dénommé pLIP1, apte à recevoir une protéine P2 est, quant à lui, dit non chargé.

La présente invention a également pour objet un microorganisme obtenu par transformation génétique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par modification appropriée d'une souche appropriée d'*E. Coli*, par un vecteur conforme à l'invention et notamment par transformation, lorsque ledit vecteur est un plasmide.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ledit microorganisme est avantageusement une souche CC118 d'*E. Coli* transformée par le plasmide pEP1726.

Une telle souche transformée par ledit plasmide a été déposée en date du 2 juin 1989 sous le numéro I-862 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

Ladite souche est dénommée SEP 1726 par les Inventeurs.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ledit microorganisme est avantageusement une souche CC118 d'*E. Coli* transformée par le plasmide pLIP1.

Une telle souche transformée par ledit plasmide a été déposée en date du 7 juin 1990 sous le numéro I-954 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

Un tel vecteur, non chargé, a l'avantage de permettre l'insertion de n'importe quelle séquence codant pour une protéine, au niveau de ce site de restriction unique.

Cette modification du gène de structure de la phosphatase alcaline introduit en outre un déphasage du cadre de lecture de la séquence nucléotidique située en aval, laquelle séquence est caractéristique de la partie fonctionnelle de la *phoA*.

Ce vecteur non-chargé, qui correspond au plasmide pLIP1 défini ci-dessus, n'exprime donc pas l'activité phosphatase alcaline.

La formule IV ci-après présente un alignement des séquences nucléotidiques et protéiques correspondant au gène *phoA* natif (A), au gène *phoA* modifié porté par le vecteur pLIP1 non chargé (B), et au gène *phoA* hybride porté par le vecteur chargé (C).

## A. Phosphatase native :

5 CGG ACA CCA GAA ATG CCT GTT CTG GAA AAC CGG GCT GCT CAG  
 arg thr pro glu met pro val leu glu asn arg ala ala gln  
 +1 +6 +7

..... CTG AAA TAA  
 10 ..... leu lys stop  
 +450

## B. Introduction du site SmaI (vecteur pLIP1 non chargé) :

CGG ACA CCA GAA ATG ccc ggg TTC TGG AAA ACC GGG CTG CTC  
 15 arg thr pro glu met pro gly phe trp lys thr gly leu leu  
 +1 +6

..... TTT TGC TGA  
 ..... phe cys stop  
 20 +49

## C. Insertion et rephasage permettant d'obtenir un hybride de la phosphatase (vecteur chargé).

25 insert  
 CGG ACA CCA GAA ATG ccc 3n +1 gg gTT CTG GAA AAC CGG GCT  
 arg thr pro glu met pro xxx.x xx val leu glu asn arg ala  
 +1 +6 +7

30 GCT ... CTG AAA TAA  
 ala ... leu lys stop  
 +450

(IV)

35 Les nucléotides provenant du gène phoA natif sont indiqués en lettres majuscules. La numérotation correspond aux acides aminés de la phosphatase alcaline mature. Les pointillés correspondent aux portions de séquences non représentées. Les nucléotides correspondant au site de restriction SmaI introduit dans le gène phoA sont indiqués en lettres minuscules (cccggg) (B). Le déphasage du cadre de lecture ainsi introduit entraîne la synthèse d'une protéine aberrante de 49 acides aminés (B). L'introduction au site SmaI,  
 40 d'une séquence de 3n + 1 paires de bases (insert) ne contenant pas de codon de terminaison, permet de rephaser le gène phoA et d'obtenir une protéine hybride (C). De plus, si la séquence 3n + 1 dans son orientation inverse renferme un codon de terminaison, seule l'introduction de cette séquence dans l'orientation souhaitée permettra d'obtenir une protéine présentant une activité phosphatase.

Conformément à l'invention, le promoteur est choisi dans le groupe qui comprend le promoteur du gène phoA et tout promoteur plus fort que le promoteur du gène phoA.

45 Le promoteur du gène phoA, notamment, est un promoteur inductible qui est activé lorsque la concentration en phosphate dans le milieu de culture des bactéries devient très faible.

Un tel promoteur a notamment l'avantage de permettre la production des protéines hybrides, dans un milieu de culture pauvre en phosphate. L'appauvrissement en phosphate du milieu au cours de la culture  
 50 des bactéries permet une induction de la synthèse des protéines hybrides, après que la masse bactérienne ait augmenté. L'avantage d'un tel système inductible est de réduire les risques de protéolyse en cours de production, dans la mesure où les protéines extraites sont synthétisées en fin de culture. L'homogénéité de l'hybride s'en trouve augmentée.

La présente invention a également pour objet un processus d'expression d'une protéine hybride  
 55 conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus dans un microorganisme conforme à l'invention.

Deux propriétés de la protéine hybride conforme à l'invention doivent être soulignées :

(1) l'extrême simplicité de sa production et l'absence d'étapes longues et difficiles de purification ; et

(2) sa stabilité au cours de la production par la bactérie, pendant le stockage dans différentes conditions, et durant le test enzymatique, puisque l'activité enzymatique persiste pendant plus de 24 heures en présence du substrat.

La présente invention a également pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est constitué par une protéine hybride conforme à l'invention.

Un tel réactif trouve notamment application dans des dosages immunoenzymologiques, dans la détection de récepteurs ou en tant que marqueurs histochimiques.

La présente invention a également pour objet un procédé de dosage immunoenzymologique de protéines, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter des protéines présentes dans un fluide biologique en mettant en présence ledit fluide biologique avec le réactif de diagnostic conforme à l'invention et en ce que la présence dudit réactif sous forme de complexe ou sous forme libre est révélée par une réaction colorimétrique appropriée.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lesdites protéines sont des antigènes.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lesdites protéines sont des anticorps.

La présente invention a, de plus, pour objet une trousse prête à l'emploi pour la mise en oeuvre dudit dosage immunoenzymologique, caractérisée en ce qu'elle comprend outre les quantités appropriées de tampons et réactifs utiles pour la mise en oeuvre dudit dosage, des quantités appropriées du réactif conforme à l'invention.

Le réactif conforme à l'invention présente l'avantage d'être directement utilisable alors que habituellement, dans le cadre d'un dosage EIA ou ELISA, l'antigène ou l'anticorps est lié de façon covalente à une enzyme, le couplage étant réalisé par voie chimique. Pour être efficace, un tel couplage doit être réalisé à partir de deux composants hautement purifiés.

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage de banques d'ADNc ou d'acide nucléique génomique ou de sélection de clones recombinants, caractérisé en ce que l'on révèle la présence éventuelle d'une enzyme exportée ou sécrétée à partir de clones de bactéries ou de cellules eucaryotes ayant éventuellement intégrées un plasmide, un phage, un cosmide ou un chromosome recombinant recherché comportant une séquence nucléique hybride conforme à l'invention par une réaction colorimétrique ou une sélection sur un milieu de culture approprié.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lorsque l'enzyme est la phosphatase alcaline, on révèle la présence de l'enzyme exportée ou sécrétée à l'aide d'un substrat approprié de ladite enzyme.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lorsque l'enzyme est la  $\beta$ -lactamase, on révèle la présence de l'enzyme exportée ou sécrétée à l'aide d'un milieu contenant de l'ampicilline.

En effet, un système d'expression comportant en aval de la séquence de la protéine P2 insérée, le gène spécifiant la  $\beta$ -lactamase, permet de cloner efficacement et exclusivement des phases ouvertes de lecture. Ces constructions conduisent à la synthèse de protéines hybrides comportant les polypeptides recherchés suivis de la  $\beta$ -lactamase fonctionnelle. Les bactéries exprimant de telles protéines sont alors sélectionnées par leur résistance à l'ampicilline.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

#### Exemple 1 : Procédé de production du plasmide pEP1726.

- préparation du fragment Sau 3A I-Sau 3A I codant pour l'éributoxine a : le fragment de restriction Sau 3A I-Sau 3A I de 192 paires de bases codant pour l'éributoxine sans séquence signal, a été préparé à partir de la forme répliquative du phage M13mp19 (-2 GAT, -1 CCC, +63 GAT)ea contenant le gène Ea portant des mutations au niveau de 3 codons, ces modifications entraînant la formation de deux nouveaux sites de restriction Sau 3A I dans le gène : -2 TAC (Tyr) devient GAT (Asp) ; -1 ACC (Thr) devient CCC (Pro) ; +63 TAG (AMB) devient GAT (Asp) (voir formule I) ; ce fragment est mis en présence du vecteur pJC2431 ouvert par coupure partielle avec Bcl I et d'ADN ligase. Les ligations ont été effectuées dans I tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 10 mM MgCl<sub>2</sub> 10 mM DTT ; 0,5 mM ATP ; 100 µg/ml BSA ; avec 1 U d'ADN ligase du phage T4 et un rapport de concentrations vecteur/insert de 1/10. La déphosphorylation du

vecteur a été réalisée d'après Maniatis et al.

- La figure 1 représente le plasmide pJC2431 portant le gène de structure de la phosphatase alcaline sous le contrôle de son propre promoteur (Lazzaroni et al., 1985). Ce plasmide présente trois sites de restrictions Bcl I : Bcl I<sup>1</sup> situé en amont du promoteur de phoA, Bcl I<sup>2</sup> et Bcl I<sup>3</sup> situés respectivement au  
5 niveau des codons +28 et +363 du gène phoA ; l'insertion de l'ea dans le site Bcl I<sup>2</sup> permet d'obtenir le plasmide pEP1726 présentant un intérêt pour la production d'une protéine hybride conforme à l'invention.

L'enzyme Bcl I ne pouvant couper l'ADN au niveau des sites de restriction méthylés par la dam-méthylase, une souche dam<sup>-</sup> GM2163 est transformée par pJC2431, afin de préparer du plasmide non méthylé. On procède en suite à une digestion partielle de pJC2431 par Bcl I, et à une déphosphorylation.  
10 L'ADN correspondant au plasmide ouvert (une seule coupure par Bcl I sur les trois possibles) est ensuite isolé sur un gel d'agarose à bas point de fusion suivant le protocole de Maniatis et al. (1982).

**Exemple 2 : Expression de la protéine hybride ea/phoA28.** (insertion au niveau aa28 de la  
15 phosphatase alcaline).

La souche CC118 ( $\Delta$ phoA20) a été transformée avec le mélange de ligation décrit à l'exemple 1. Les transformants Ap<sup>r</sup> (résistants à l'ampicilline) obtenus ont été purifiés sur milieu inducteur de la phosphatase alcaline contenant du XP et de l'ampicilline.

20 Le milieu inducteur est le TES, (solution de :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/l ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 mg/l ; KCl 75 mg/l ; triéthanolamine 7,5 g/l ; ajustée à pH 7,5). L'addition du substrat chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (XP 0,4 g/l) à ce milieu permet de révéler l'activité phosphatase alcaline sur boîte de pétri, le XP conférant une coloration bleu aux colonies qui l'hydrolysent.

Trois types de transformants ont été distingués suivant leur capacité à hydrolyser le XP des clones  
25 blancs, des clones bleus et enfin des clones bleus très foncés. Ces deux dernières catégories présentent donc une activité phosphatase alcaline due au plasmide qu'elles contiennent.

L'analyse des fragments de restriction de l'ADN plasmidique de ces différents transformants a permis de déterminer le site et l'orientation de l'insertion du gène ea dans chaque cas.

Les clones bleu foncé correspondent à des insertions d'un ou deux fragments Sau 3A I-Sau 3A I au  
30 niveau du site Bcl I<sup>1</sup>, c'est-à-dire en amont du gène phoA et de son promoteur. L'activité phosphatase alcaline de ces clones est identique à celle de la souche CC118 (pJC2431).

Les clones bleus moins prononcés correspondent à une insertion en phase d'une copie du gène ea au niveau du site Bcl I<sup>2</sup> (pEP1726).

Les clones blancs proviennent de l'insertion du gène ea au niveau du site Bcl I<sup>2</sup> mais dans l'orientation  
35 inverse de celle du gène phoA.

Le protocole utilisé pour l'extraction des protéines périplasmiques par choc osmotique est celui décrit par Dvorak et al. (1967).

40 **Exemple 3 : Procédé d'obtention du plasmide pL1P1 (vecteur d'expression non chargé) et du plasmide pL1P1/P2 (vecteur d'expression chargé).**

1. Introduction d'un site de clonage dans le gène phoA.

45 Le gène phoA (phosphatase alcaline de *E. Coli*) porté par le plasmide pJC2431 a été modifié par mutagenèse dirigée afin d'introduire un site de restriction unique SmaI après le codon correspondant au sixième acide aminé de la protéine mature, a été choisi pour deux raisons :

- la région N-terminale de la phosphatase peut être modifiée sans altération majeure de son activité  
50 enzymatique,  
la présence des premiers acides aminés N-terminaux est nécessaire pour permettre le clivage du peptide signal.

Ce site a été introduit de manière à entraîner un décalage du cadre de lecture du gène phoA. En conséquence, ce gène modifié est incapable d'exprimer une protéine fonctionnelle.

55

2. Introduction de séquences d'ADN exogènes dans le gène phoA.

Les fragments d'ADN destinés à être introduits dans le gène *phoA* au site *SmaI* sont obtenus par synthèse nucléotidique ou proviennent de séquences géniques clonées. Ils sont préparés de manière à répondre aux exigences suivantes :

- (1) leurs extrémités 5' et 3' doivent être franches, le site *SmaI* générant des extrémités franches.
- (2) leur introduction dans l'orientation souhaitée doit permettre le rephasage de la séquence du gène *phoA* en aval du site d'insertion et doit permettre la synthèse d'une protéine hybride présentant une activité phosphatase.
- (3) leur séquence dans l'orientation inverse de celle souhaitée doit présenter un codon de terminaison en phase avec le cadre de lecture. Ceci doit entraîner une absence de fonction du gène hybride obtenu en cas d'insertion dans cette orientation.

Les constructions géniques sont obtenues par les techniques classiques de génie génétique.

Seuls les vecteurs ayant inséré les séquences exogènes dans le bon sens ont une phase ouverte de lecture permettant l'expression d'une protéine hybride constituée du polypeptide codé par la séquence insérée et de la phosphatase alcaline.

### 3. Sélection des gènes hybrides.

Après ligation du fragment d'ADN souhaité dans le vecteur pLIP1, les plasmides recombinants sont utilisés pour transformer la souche bactérienne CC118, mutant de *E. Coli* n'exprimant pas la phosphatase alcaline. Seuls les clones bactériens renfermant la construction génique attendue seront susceptibles de récupérer une activité phosphatase. Cette activité peut être visualisée en cultivant les bactéries sur un milieu de sélection approprié contenant un substrat chromogène de la phosphatase. Les clones positifs apparaissent en bleu.

Ainsi, l'apparition de la coloration bleue, indiquant que la bactérie exprime une protéine présentant une activité phosphatase, signifie :

- que le fragment d'ADN exogène a été inséré correctement, dans la bonne orientation, permettant un rephasage de la séquence codante de la phosphatase,
- que la protéine hybride, produit du gène recombinant, est correctement exportée dans le périplasme de la bactérie,
- que la protéine hybride réalise des dimères afin de former l'homodimère correspondant à la forme active de la phosphatase,
- et donc que l'insertion de la séquence protéique exogène dans la phosphatase n'altère pas de façon importante son activité enzymatique.

### Exemple 4 : Expression des protéines hybrides *ea/phoA6* et *Angio/phoA6* :

#### 1. Introduction d'une protéine P2 dans la phosphatase alcaline :

Elle est réalisée entre les acides aminés 6 et 7 de la phosphatase mature. Lesdites protéines hybrides sont constituées :

- des 21 acides aminés du peptide signal de la phosphatase. Ce peptide permet l'exportation de la protéine vers l'espace périplasmique de la bactérie. Cette localisation est essentielle pour l'acquisition de l'activité phosphatase et pour une extraction commode de la protéine hybride.
- des 6 acides aminés N-terminaux de la phosphatase. Leur présence permet le clivage du peptide signal pendant le passage dans le périplasme.
- de la séquence des acides aminés de la protéine exogène insérée dans la phosphatase. Les impératifs de clonage peuvent éventuellement introduire aux extrémités de cette séquence un ou quelques acides aminés supplémentaires.
- des 444 derniers acides aminés de la phosphatase.

#### 2. Production des protéines hybrides :

Les bactéries sont cultivées en milieu liquide pauvre en phosphates. Lorsque le phosphate est épuisé, le promoteur phosphatase est activé et entraîne la transcription du gène hybride. L'intérêt de ce phénomène

ne d'induction est de permettre une synthèse rapide des protéines hybrides en fin de culture (4 à 5 heures de culture) et donc de limiter les risques de dégradation protéolytique. Les protéines du périplasma bactérien sont extraites par choc osmotique. L'utilisation des hybrides protéiques (comme réactifs par exemple) ne nécessite pas de purification supplémentaire.

5

### 3. Hybride toxine/phosphatase (ea/phoA6).

#### 10 - Construction génique :

Un fragment de 196 paires de bases comprenant la séquence codante de l'érabutoxine a, flanquée aux extrémités 5' et 3' d'un site SaU3AI, comme précisé ci-dessus à l'exemple 1 a été réparé à la Klenow et introduit au site SmaI du plasmide pLIP1. La présence d'un codon de terminaison en phase, dans le fragment en orientation inverse, a permis une sélection visuelle des clones recombinants recherchés selon le principe précédemment décrit à l'exemple 2. Le plasmide ainsi obtenu a été dénommé pLIP1/Ea. La chaîne polypeptidique attendue (ea/phoA6) comprend successivement : le peptide signal de la phosphatase, les 6 premiers acides aminés de la phosphatase, deux acides aminés supplémentaires introduits par les nécessités du clonage (Asp, Pro), les 62 acides aminés de l'érabutoxine a, deux acides aminés supplémentaires introduits par les nécessités du clonage (Asp, Arg), les 444 derniers acides aminés de la phosphatase. Le peptide signal est clivé lors du passage dans le périplasma.

#### 25 - Caractéristiques de la protéine hybride ea/phoA6 :

25

La protéine hybride ea/phoA6 a été produite selon les modalités décrites précédemment.

Trois caractéristiques de l'hybride ont été étudiées :

- (1) son activité enzymatique,
- (2) la présence de déterminants antigéniques spécifiques de l'érabutoxine,
- 30 (3) la possibilité d'utiliser l'hybride pour effectuer un dosage de toxine libre.

Ces caractéristiques ont été comparées avec celles de l'hybride ea/phoA28 (exemple 2), produit du plasmide pEP1726, obtenu par introduction de l'érabutoxine dans la phosphatase après la position 28, sans modification préalable du gène phoA, en utilisant un site de restriction préexistant.

- a. L'activité enzymatique des hybrides a été évaluée par comparaison avec celle de la phosphatase alcaline native obtenue dans les mêmes conditions de production. L'activité spécifique d'extraits périplasmiques bactériens, obtenus par choc osmotique, contenant les différentes protéines a été déterminée. La concentration en protéines de l'extrait est déterminée à partir de son absorbance à 546 nm et d'une courbe-étalon réalisée par dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). L'activité enzymatique est mesurée sur 20 µl d'extrait. Après 15 min d'incubation à 37°C en présence de p-nitro phényl phosphate (pNPP) 25 mM, la réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de NaOH 1M. L'absorbance de l'échantillon est lue à 410 nm (coloration jaune due à la formation de pNPOH). L'activité enzymatique spécifique (AS), en nmoles de pNPP hydrolysé par minute par mg de protéines, est donnée par la formule :

$$45 \quad AS = \frac{A_{410} \cdot 5,55}{(\text{mg protéines/ml}) \cdot 2 \cdot 10^{-2}}$$

L'évaluation de l'activité des hybrides est exprimée en pourcentage d'activité spécifique correspondant à la phosphatase native :

50

55

Phosphatase native :	100 % (A.S.)
ea/phoA6 :	50 %
ea/pho28 :	30 %

b. la présence de déterminants antigéniques spécifiques de l'érabutoxine portés par la protéine hybride

ea/phoA6 et ea/phoA28 a été étudiée par test ELISA. Ces protéines sont capables de se fixer sur l'anticorps monoclonal Ma2-3, spécifique d'un déterminant antigénique porté par la toxine native. De plus, il existe une compétition de fixation entre ea/phoA6 ou ea/phoA28 et la toxine native. Afin d'évaluer le niveau de structuration de la toxine dans les hybrides, on a comparé par test ELISA, sa reconnaissance par un sérum dirigé contre la toxine native et par un sérum dirigé contre la toxine dénaturée. Pour 60 % de l'hybride ea/phoA6, la toxine est correctement structurée, alors que cette proportion n'est que de 32 % pour l'hybride ea/phoA28.

c. La figure 2 illustre un dosage de l'erabutoxine a par un test ELISA utilisant l'hybride ea/phoA6.

La compétition de fixation entre ea/phoA6 et la toxine libre sur l'anticorps monoclonal Ma2-3 a été étudiée par test ELISA. Après adsorption de l'anticorps sur plaque ELISA, ea/phoA6 (choc osmotique dilué 10 fois) est ajoutée en présence de différentes quantités de toxine.

$$\text{Le Rapport} = \frac{\text{quantité d'hybride fixé en présence de toxine (B)}}{\text{quantité d'hybride fixé en l'absence de toxine (Bo)}}$$

est exprimé en fonction de la quantité de toxine libre. La sensibilité de ce test, évaluée par la quantité de toxine pour laquelle le rapport B/Bo = 0,5, est de 2,5 pmole, soit 17 ng. Cette sensibilité est équivalente à celle d'un test RIA utilisant de la toxine tritiée.

#### 4. Hybride angiotensine I/phosphatase alcaline (Angio/phoA6).

##### - Construction génique :

Un fragment de 31 paires de bases capable de coder pour l'angiotensine I a été obtenu par hybridation de deux oligonucléotides synthétiques complémentaires. Ce fragment a été introduit au site SmaI du plasmide pLIP1. La séquence de ce fragment a été déterminée de manière à introduire un codon de terminaison en phase avec le cadre de lecture de la phosphatase lorsque son intégration se produit dans l'orientation inverse de celle souhaitée. Ainsi, après séquençage de plusieurs clones sélectionnés pour l'expression d'une activité phosphatase (clones bleus), tous correspondaient à la construction souhaitée. Le plasmide ainsi obtenu a été dénommé pLIP1/Angio. La chaîne polypeptidique attendue (Angio/phoA6) comprend successivement : le peptide signal de la phosphatase, les 6 premiers acides aminés de la phosphatase, les 10 acides aminés de l'angiotensine 1, un acide aminé supplémentaire introduit par les nécessités du clonage (Arg), les 444 derniers acides aminés de la phosphatase. Le peptide signal est clivé lors du passage dans le périplasme.

##### - Caractéristiques de la protéine hybride Angio/phoA6 :

La protéine hybride Angio/phoA6 a été produite selon les modalités décrites précédemment.

Trois caractéristiques de l'hybride ont été étudiées :

- (1) son activité enzymatique,
- (2) sa reconnaissance par un sérum dirigé contre l'angiotensine I,
- (3) la possibilité d'utiliser l'hybride pour effectuer un dosage hormonal.

a. L'activité enzymatique de l'hybride Angio/phoA6 a été évaluée selon la procédure décrite précédemment pour l'hybride ea/phoA6. Cette évaluation est exprimée en pourcentage d'activité spécifique correspondant à la phosphatase native :

Phosphatase native :	100 % (A.S.)
Angio/phoA6 :	93 %



b. La reconnaissance de la protéine hybride Angio/PhoA6 par un sérum dirigé contre l'angiotensine I a été étudiée par test ELISA. Un sérum de porc dirigé contre des immunoglobulines de lapin a été adsorbé sur une plaque ELISA. Un sérum de lapin dirigé contre de l'angiotensine I couplée à de la sérum albumine bovine a ensuite été fixé sur le sérum de porc. Enfin, la protéine hybride Angio/phoA6, produite par choc osmotique, a été ajoutée au système. Sa fixation sur les anticorps dirigés contre l'angiotensine a été révélée par son activité phosphatase, en ajoutant un substrat chromogène de l'enzyme. La spécificité de cette reconnaissance est démontrée par l'existence d'une compétition de fixation entre l'hybride et de l'hormone libre.

c. La figure 3 illustre un dosage de l'angiotensine I par test ELISA utilisant l'hybride Angio/phoA6. La compétition de fixation entre Angio/phoA6 et de l'angiotensine I libre sur un sérum de lapin dirigé contre cette hormone a été étudiée par test ELISA. Le sérum de lapin est fixé au préalable par un sérum de porc anti-immunoglobuline de lapin adsorbé sur plaque ELISA. L'hybride Angio/phoA6 (choc osmotique dilué 20 fois) est ajouté en présence de différentes quantités d'angiotensine I.

15

$$\text{Le rapport : } \frac{B}{B_0} = \frac{\text{quantité d'hybride fixé en présence d'hormone}}{\text{quantité d'hybride fixé en l'absence d'hormone}}$$

20

est exprimé en fonction de la quantité d'hormone libre. La sensibilité de ce test, évaluée par la quantité d'hormone pour laquelle le rapport  $B/B_0 = 0,5$ , est de 0,09 pmole, soit 0,12 ng. Cette sensibilité est équivalente à celle de tests RIA utilisés en pratique diagnostique courante (kit commercialisé par COMPAGNIE ORIS INDUSTRIE FRANCE).

25

#### Exemple 5 : Stabilité des protéines hybrides de la phosphatase.

30

##### 1. Induction de la synthèse des hybrides de la phosphatase :

Dans le vecteur d'expression réalisé, pLIP1, le promoteur du gène phoA a été conservé pour permettre l'expression des gènes hybrides. Il s'agit d'un promoteur inductible qui est activé lorsque la concentration en phosphate dans le milieu de culture des bactéries devient très faible.

35

Dans les conditions choisies (voir exemple 4.2), la synthèse des protéines hybrides, mesurée par apparition de l'activité phosphatase, débute après 3 heures 30 de culture. L'extraction se fait lorsque le maximum d'accumulation des hybrides est atteint, soit après 4 heures 30 à 5 heures.

40

##### 2. Stabilité des protéines hybrides :

La stabilité des protéines hybrides a été étudiée dans trois situations :

45

- (1) stabilité au cours de leur production,
- (2) stabilité au cours de leur utilisation,
- (3) stabilité au cours des opérations de stockage.

50

a. La stabilité des hybrides et de la phosphatase native a été étudiée en visualisant leur intégrité après marquage à la méthionine  $^{35}\text{S}$ , immunoprécipitation, et électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les bactéries sont cultivées dans les conditions habituelles de production. Le marquage des hybrides à la méthionine  $^{35}\text{S}$  est réalisé au moment de l'induction de leur synthèse pendant 30 minutes. Les protéines immunoprécipitées avec un anticorps monoclonal spécifique de la phosphatase alcaline apparaissent sous forme d'une espèce moléculaire unique. Les masses moléculaires observées sont très proches des valeurs théoriques attendues : 46 000 daltons environ pour la phosphatase, 52 000 daltons environ pour ea/phoA6, et 47 000 daltons environ pour Angio/phoA6. En prolongeant la culture bactérienne de 4 heures après le marquage (chasse), aucune dégradation des protéines marquées n'est observée. Ces résultats montrent que les protéines hybrides de la phosphatase ne subissent aucune dégradation protéolytique au cours de leur production. Ceci est loin d'être le cas pour les protéines hybrides obtenues par fusion de la protéine A

55

du staphylocoque ou de la  $\beta$ -galactosidase d'*E. Coli*. Dans ces systèmes, la majeure partie de la protéine hybride attendue subit une dégradation protéolytique.

b. Après 24 heures d'incubation dans les conditions de révélation du test ELISA, aucune baisse significative d'activité enzymatique des hybrides n'est observée. Ce résultat démontre la stabilité du réactif en cours d'utilisation. En conséquence, le temps de révélation d'un test ELISA peut être prolongé afin d'augmenter la sensibilité.

c. Après 10 cycles de congélation à  $-180^{\circ}\text{C}$  suivie de décongélation à  $+37^{\circ}\text{C}$ , c'est-à-dire dans des conditions drastiques, 95 % de l'activité phosphatase des hybrides est conservée. Des études préliminaires ont fourni des résultats similaires concernant la lyophilisation. Il semble donc que les hybrides de la phosphatase puissent rester parfaitement stables dans des conditions habituelles de conditionnement.

#### Exemple 6 : Procédé de criblage de banques d'ADNc ou génomiques, conforme à l'invention.

Les systèmes de clonage et d'expression associés actuellement sur le marché sont intégrés dans des bactériophages ou des plasmides. Leurs caractéristiques communes essentielles sont les suivantes : ils possèdent une partie du gène *lac Z* d'*E. Coli* ( $\beta$ -galactosidase) modifié de telle sorte qu'il contienne un, ou plus souvent une série de sites uniques de restriction. L'insertion de fragments de DNA de ce site entraîne généralement la perte de l'activité  $\beta$ -galactosidase. Cette propriété permet de reconnaître les clones recombinants qui forment des colonies ou des plages de lyse blanches alors que les clones sans insert apparaissent bleus en présence de X-Gal. Par ailleurs, les séquences de DNA insérées peuvent être exprimées sous forme de protéines de fusion avec un fragment de la  $\beta$ -galactosidase. Leur détection est alors possible à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines recherchées. La révélation s'effectue par différentes techniques marquage à l'iode<sup>125</sup> ou l'utilisation de conjugués anticorps-enzymes (Molecular Cloning, 1989, 12-14). La substitution dans ces systèmes du gène *lac Z* modifié par le gène *phoA* modifié, notamment comme décrit pour le plasmide pLIP1, conduit à l'apparition de clones bleus et blancs en présence de XP. Dans ce cas, à l'inverse des systèmes utilisant la  $\beta$ -galactosidase, les clones capables de transformer le substrat colorimétrique, XP en l'occurrence, sont des clones recombinants. De plus, la simple coloration d'un clone est indicative de plusieurs propriétés. Elle signifie que : i) un fragment d'ADN a été inséré dans le gène *phoA*, ii) ce fragment code pour une phase ouverte de lecture, iii) l'insertion a permis le rephasage du gène *phoA* et son expression sous forme d'une protéine hybride, iv) cette protéine hybride est exportée dans le périplasme, v) la phosphatase alcaline recombinante dimérise pour former une enzyme active qui hydrolyse ses substrats et en particulier les substrats colorimétriques. Ainsi, les informations révélées par le test colorimétrique sont beaucoup plus nombreuses que dans le cas de la  $\beta$ -galactosidase. L'utilisation de cette dernière enzyme permet de distinguer les clones avec insert et les clones sans insert sans prévaloir de l'existence ou des propriétés d'une protéine recombinante, alors que l'utilisation de la phosphatase alcaline permet d'identifier directement les clones capables de synthétiser une protéine hybride exportable et possédant un domaine *phoA* structuré et enzymatiquement actif. Par ailleurs, la capacité des protéines hybrides à être exportées vers le périplasme n'est pas sans incidence sur la structuration du polypeptide inséré dans *phoA*. Dans le cas de l'éributoxine a, son exportation s'accompagne de la formation de ses ponts disulfures. Elle adopte ainsi une conformation lui permettant d'être reconnue par des anticorps spécifiques de la forme structurée de la toxine. La plupart des anticorps ont ce type de spécificité conformation dépendante et ne reconnaissent que des protéines correctement structurées. Enfin, il est possible de tirer parti de l'activité enzymatique des protéines hybrides synthétisées pour mettre en évidence très simplement une interaction avec des anticorps spécifiques de la protéine insérée. Une simple empreinte des colonies synthétisant les protéines recombinantes sur un filtre de nitrocellulose préalablement saturé par une solution d'anticorps spécifiques, suivie d'une révélation avec un réactif colorimétrique de la phosphatase, permettra de révéler les clones sécrétant une protéine hybride capable de réagir avec les anticorps.

Ce procédé peut s'avérer extrêmement performant également pour identifier les épitopes d'une protéine définie. Des fragments d'ADN codant pour cette protéine peuvent être obtenus par synthèse, par action d'enzymes de restriction sur le gène entier ou par toute autre méthode comme l'utilisation des techniques de PCR (polymerase chain reaction) par exemple et intégrés dans le gène *phoA*. L'étude de l'interaction des protéines recombinantes résultant de ces constructions avec des sérums ou des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine entière permet alors d'identifier les régions de la protéine portant les épitopes.

**Exemple 7 : Procédé de sélection de clones recombinants conforme à l'invention :**

L'utilisation du gène *bla* qui code pour la  $\beta$ -lactamase, une enzyme qui confère à la bactérie qui l'exprime la résistance à l'ampicilline permet de disposer d'un crible de sélection des clones recombinants qui seuls peuvent se développer en présence de l'antibiotique. Ce type de sélection permet la recherche de séquences codantes très rares.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

**Revendications**

1°) Séquence d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence hybrid comprenant successivement la séquence leader du gène de structure d'une protéine appropriée P1 exportée ou sécrétée par un microorganisme, notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une séquence d'acide nucléique codant pour un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite protéine P1 mature, une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine P2, puis un fragment codant pour au moins un fragment fonctionnel de la séquence mature d'une enzyme appropriée, l'ensemble de ces fragments étant en phase de lecture et codant pour une protéine hybride présentant à la fois les propriétés de l'enzyme et certaines propriétés de ladite protéine P2, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un anticorps, un antigène ou un récepteur.

2°) Séquence hybride selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'enzyme est choisie dans le groupe qui comprend notamment la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la glucose phosphatase acide, la phosphodiesterase cyclique et la  $\beta$ -lactamase.

3°) Séquence hybride selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que le fragment de séquence codant pour la protéine P2 est notamment choisi dans le groupe qui comprend les séquences codant pour les hormones peptidiques, les séquences codant pour une toxine et les séquences codant pour un fragment simple chaîne analogue au fragment variable des immunoglobulines (immunoglobulines recombinantes).

4°) Séquence hybride selon la revendication 3, caractérisée en ce que la toxine est avantageusement une neurotoxine.

5°) Séquence hybride selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la protéine P1 est identique à l'enzyme.

6°) Séquence hybride selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la protéine P1 est différente de l'enzyme.

7°) Séquence hybride selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence hybride comprenant successivement le fragment leader du gène de structure d'une enzyme exportée ou sécrétée par un microorganisme, notamment choisi dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une séquence d'acide nucléique codant pour un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite enzyme mature, une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine P2, puis un fragment codant pour au moins un fragment fonctionnel de la séquence mature de ladite enzyme, l'ensemble de ces fragments étant en phase de lecture et codant pour une protéine hybride présentant à la fois les propriétés de l'enzyme et certaines propriétés de ladite protéine, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un anticorps, un antigène ou un récepteur.

8°) Séquence hybride selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement la séquence leader du gène de structure de la phosphatase alcaline, un fragment codant pour, au plus, les 28 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline mature, une séquence d'ADN codant pour une protéine P2 ou un fragment de celle-ci, puis un fragment codant pour, au moins, les 422 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline, l'ensemble de ces fragments étant en phase de lecture et formant une séquence d'ADN hybride codant pour une protéine hybride présentant à la fois les propriétés de la phosphatase alcaline, en particulier son activité enzymatique et certaines des propriétés de la protéine P2, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un antigène, un anticorps ou un récepteur.

9°) Séquence hybride selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement la séquence d'acide nucléique codant pour le peptide leader de la phosphatase alcaline, la séquence codant pour les 28 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline, la séquence codant pour l'éributoxine a

(ea) mature, et la séquence codant pour les 422 aminoacides C-terminaux de la phosphatase alcaline.

10°) Séquence hybride selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence codant pour l'érabutoxine a comprend 192 paires de bases et deux sites de restriction Sau 3 AI supplémentaires.

5 11°) Séquence hybride selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence n° 1 ci-après :

													Arg	Thr	Pro
10	Fragment leader	du gène	de structure	de la	phoA	CGG	ACA	CCA							
	Glu	Met	Pro	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	Thr
	GAA	ATG	CCT	GTT	CTG	GAA	AAC	CGG	GCT	GCT	CAG	GGC	GAT	ATT	ACT
	Ala	Pro	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	↓Asp	Pro	Arg	Ile	Cys
	GCA	CCC	GGC	GGT	GCT	CGC	CGT	TTA	ACG	GGT	GAT	CCC	AGG	ATA	TGT
15	Phe	Asn	His	Gln	Ser	Ser	Gln	Pro	Gln	Thr	Thr	Lys	Thr	Gln	Ser
	TTT	AAC	CAT	CAG	TCA	TCG	CAA	CCG	CAA	ACC	ACT	AAA	ACT	TGT	TCA
	Pro	Gly	Glu	Ser	Ser	Cys	Tyr	Asn	Lys	Gln	Trp	Ser	Asp	Phe	Arg
	CCT	GGG	GAG	AGC	TCT	TGC	TAT	AAC	AAG	CAA	TGG	AGC	GAT	TTC	CGT
	Gly	Thr	Ile	Ile	Glu	Arg	Gly	Cys	Gly	Cys	Pro	Thr	Val	Lys	Pro
20	GGA	ACT	ATA	ATT	GAA	AGG	GGA	TGT	GGT	TGC	CCC	ACA	GTG	AAG	CCC
	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Cys	Cys	Glu	Ser	Glu	Val	Cys	Asn	Asn	↓Asp
	GGT	ATT	AAA	CTC	AGT	TGT	TGC	GAA	TCA	GAG	GTC	TGC	AAC	AAT	GAT
	Gln	Thr													

25 CAG ACT-fragment codant pour au moins les 422 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline.

12°) Séquence hybride selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement la séquence leader du gène de structure de la phosphatase alcaline, un fragment codant pour les 6 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline mature, une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine P2 ou un fragment de celle-ci, puis un fragment codant pour les 444 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline, laquelle séquence comprend en outre, notamment pour la mise en phase de lecture de l'ensemble de ces fragments, en aval et/ou en amont du fragment codant pour la protéine P2, un fragment d'acide nucléique approprié, laquelle séquence hybride, en phase de lecture, code pour une protéine hybride présentant à la fois les propriétés de la phosphatase alcaline et certaines des propriétés de la protéine différente de l'enzyme, notamment celle d'interagir spécifiquement avec un antigène, un anticorps ou un récepteur.

13°) Séquence hybride selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement la séquence leader du gène de structure de la phosphatase alcaline, la séquence codant pour les 6 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline, la séquence d'acide nucléique codant pour l'angiotensine I, un fragment comprenant la séquence AGG G et qui permet de rephaser le gène de la phosphatase alcaline, puis un fragment codant pour, au moins, les 444 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline.

14. Séquence hybride selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence n° 2 ci-après :

45

50

55

-21  
 GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG GCA CTC TTA CCG TTA CTG  
 Met lys gln ser thr ile ala leu ala leu leu pro leu leu  
 5  
 TTT ACC CCT GTG ACA AAA GCC CGG ACA CCA GAA ATG ccc GAT  
 phe thr pro val thr lys ala arg thr pro glu met pro asp  
 10  
 CGT GTC TAT ATT CAC CCG TTT CAC CTT Agg <sup>+7</sup>gTT CTG GAA AAC  
arg val tyr ile his pro phe his leu arg val leu glu asn  
 CGG GCT GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC  
 15  
 arg ala ala gln gly asp ile thr ala pro gly gly ala arg  
 CGT TTA ACG ...  
 arg leu thr ...  
 .  
 20  
 .  
 +450  
 ... CTG AAA TAA  
 25  
 ... leu lys stop

15°) Séquence hybride selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement la séquence leader du gène de structure de la phosphatase alcaline, la séquence codant pour les 6 aminoacides N-terminaux de la phosphatase alcaline, un fragment comprenant la séquence GAT CCC, la
 30  
 séquence d'acide nucléique codant pour l'éributoxine a, un fragment comprenant la séquence GAT C, lequel fragment permet de rephaser le gène de la phosphatase alcaline, puis un fragment codant pour, au moins, les 444 aminoacides restants C-terminaux de la phosphatase alcaline.

16°) Séquence selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence n° 3 ci-après :  
 35

40

45

50

55

-21  
 GTG AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG GCA CTC TTA CCG TTA CTG  
 Met lys gln ser thr ile ala leu ala leu leu pro leu leu  
 5  
 TTT ACC CCT GTG ACA AAA <sup>-1</sup> GCC <sup>+1</sup> CGG ACA CCA GAA ATG <sup>+6</sup> CCC GAT  
 phe thr pro val thr lys ala arg thr pro glu met pro asp  
 10  
 CCC AGG ATA TGT TTT AAC CAT CAG TCA TCG CAA CCG CAA ACC  
 pro arg ile cys phe asn his gln ser ser gln pro gln thr  
 ACT AAA ACT TGT TCA CCT GGG GAG AGC TCT TGC TAT AAC AAG  
 15  
 thr lys thr cys ser pro gly glu ser ser cys tyr asn lys  
 CAA TGG AGC GAT TTC CGT GGA ACT ATA ATT GAA AGG GGA TGT  
 gln trp ser asp phe arg gly thr ile ile glu arg gly cys  
 20  
 GGT TGC CCC ACA GTG AAG CCC GGT ATT AAA CTC AGT TGT TGC  
gly cys pro thr val lys pro gly ile lys leu ser cys cys  
 GAA TCA GAG GTC TGC AAC AAT <sup>+7</sup> GAT Cgg gTT CTG GAA AAC CGG  
 25  
glu ser glu val cys asn asn asp arg val leu glu asn arg  
 GCT GCT CAG GGC GAT ATT ACT GCA CCC GGC GGT GCT CGC CGT  
 ala ala gln gly asp ile thr ala pro gly gly ala arg arg  
 30  
 TTA ACG GGT GAT CAG ACT GCC ...  
 leu thr gly asp gln thr ala ...  
 35  
 ...  
 ... <sup>+450</sup> CTG AAA TAA  
 ... leu lys stop

40 17°) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une séquence hybride comprenant successive-  
 ment un fragment d'une protéine P1 exportée ou sécrétée par un microorganisme notamment choisi dans  
 le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une protéine P2 appropriée ou un fragment de celle-ci  
 et au moins un fragment fonctionnel d'une enzyme appropriée, ladite protéine hybride possédant à la fois  
 les propriétés de l'enzyme et certaines propriétés de la protéine P2, notamment celle d'interagir spécifique-  
 45 ment avec un anticorps, un antigène ou un récepteur.

18°) Protéine hybride selon la revendication 17, caractérisée en ce que la protéine P1 est différente de  
 l'enzyme.

19°) Protéine hybride selon la revendication 17, caractérisée en ce que la protéine P1 est identique à  
 l'enzyme.

50 20°) Protéine hybride selon la revendication 17 ou la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle comprend  
 une enzyme exportée ou sécrétée par un microorganisme notamment choisi dans le groupe qui comprend  
 les bactéries et les levures, dans laquelle est insérée une protéine P2 appropriée.

21°) Protéine hybride selon la revendication 17 ou la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle comprend  
 successivement un fragment d'une enzyme exportée ou sécrétée par un microorganisme notamment choisi  
 55 dans le groupe qui comprend les bactéries et les levures, une protéine P2 appropriée, puis la séquence  
 mature complète de ladite enzyme.

22°) Protéine hybride selon l'une quelconque des revendications 17 à 21, caractérisée en ce qu'elle  
 contient une protéine P2 notamment choisie dans le groupe qui comprend les hormones peptidiques, les

fragments simple chaîne analogues aux domaines variables des immunoglobulines et les toxines, insérée au sein d'une enzyme choisie dans le groupe qui comprend notamment la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la glucose phosphatase acide, la phosphodiesterase cyclique et la  $\beta$ -lactamase.

23°) Protéine hybride selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend avantageusement une neurotoxine insérée dans la phosphatase alcaline.

24°) Protéine hybride selon la revendication 22 ou la revendication 23, caractérisée en ce que la neurotoxine est l'érabutoxine a (ea), laquelle protéine hybride présente la séquence déduite selon les formules I ou III selon la revendication 12 ou la revendication 16.

25°) Protéine hybride selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle comprend avantageusement l'angiotensine 1 insérée dans la phosphatase alcaline et présente la séquence déduite selon la formule II selon la revendication 14.

26°) Famille de vecteurs d'expression et/ou de clonage d'une protéine hybride selon l'une quelconque des revendications 17 à 25, caractérisée en ce que chaque vecteur inclut un système d'expression comprenant :

- un promoteur approprié,  
- un site de fixation aux ribosomes,  
- une séquence d'acide nucléique comportant la séquence leader du gène de structure d'une protéine P1, une séquence codant pour un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite protéine P1 mature, une séquence codant pour une protéine P2 insérée au niveau d'un site de restriction naturel et la séquence codant pour une enzyme extracytoplasmique mature ou un fragment de celle-ci, laquelle séquence d'acide nucléique correspond à une séquence hybride conforme à l'invention, et

- un terminateur de transcription, lequel système d'expression est inséré dans une structure génétique appropriée, notamment choisie dans le groupe qui comprend des plasmides, des phages, des cosmides ou des chromosomes appropriés.

27°) Vecteur selon la revendication 26, caractérisé en ce que la structure génétique est un plasmide et la protéine P1 est identique à l'enzyme.

28°) Vecteur selon la revendication 26 ou la revendication 27, caractérisé en ce que lorsque P2 est avantageusement l'érabutoxine a, on obtient un plasmide, dénommé pEP1726, présentant les propriétés suivantes :

- il comprend 6,1 kb ;  
- il est obtenu par ligation du plasmide pJC2431 portant le gène de structure de la phosphatase alcaline et le gène de résistance à l'ampicilline (AP<sup>R</sup>), -ledit plasmide étant linéarisé au site Bcl I, au niveau du codon 28 dudit gène de structure de la phosphatase alcaline, -avec le fragment Sau 3AI-Sau 3AI de 192 paires de bases codant pour l'érabutoxine a.

29°) Famille de vecteurs d'expression et/ou de clonage d'une protéine hybride selon l'une quelconque des revendications 17 à 25, caractérisée en ce que chaque vecteur inclut un système d'expression comprenant :

- un promoteur approprié,  
- un site de fixation aux ribosomes,  
- une séquence d'acide nucléique comportant la séquence leader du gène de structure d'une protéine P1, une séquence codant pour un fragment NH<sub>2</sub>-terminal de ladite protéine P1 mature, la séquence codant pour une enzyme extracytoplasmique mature ou un fragment de celle-ci et un ou plusieurs sites de restriction uniques, aptes à recevoir une séquence codant pour une protéine P2, situés à la jonction entre le fragment de séquence codant pour la protéine P1 et la séquence codant pour l'enzyme, et

- un terminateur de transcription, lequel système d'expression est inséré dans une structure génétique appropriée, notamment choisi dans le groupe qui comprend des plasmides, des phages, des cosmides ou des chromosomes appropriés.

30°) Vecteur selon la revendication 29, caractérisé en ce qu'au moins l'un des sites de restriction uniques introduit entraîne un déphasage du gène de l'enzyme, le rephasage dudit gène étant assuré par l'introduction de la séquence de la protéine P2.

31°) Vecteur selon la revendication 29 ou la revendication 30, caractérisé en ce qu'on obtient un plasmide dénommé pLIP1 présentant les propriétés suivantes :

- il comprend environ 5,9 kb, et  
- il est obtenu par mutagénèse dirigée du gène *phoA* porté par le plasmide pJC2431 de manière à introduire un site de restriction unique SmaI, correspondant à la position +6 de la protéine mature.

32°) Microorganisme obtenu par transformation génétique, caractérisé en ce qu'il est obtenu par modification appropriée d'une souche appropriée d'*E. Coli* par un vecteur selon l'une quelconque des revendications 26 à 31.

- 33°) Microorganisme selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il est avantageusement une souche CC118 d'*E. Coli* transformée par le vecteur pEP1726.
- 34°) Microorganisme selon la revendication 33, dénommé SEP 1726, caractérisé en ce qu'il a été déposée en date du 2 juin 1989 sous le numéro I-862 auprès de la Collection Nationale des Cultures de
- 5 Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.
- 35°) Microorganisme selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il est avantageusement une souche CC118 d'*E. Coli* transformée par le plasmide pLIP1.
- 36°) Microorganisme selon la revendication 35, caractérisé en ce qu'il a été déposée en date du 7 juin 1990 sous le numéro I-954 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut
- 10 Pasteur.
- 37°) Processus d'expression d'une protéine hybride selon l'une quelconque des revendications 17 à 25, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 26 à 31, dans un microorganisme selon l'une quelconque des revendications 32 à 36.
- 38°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est constitué par une protéine hybride selon l'une
- 15 quelconque des revendications 17 à 25.
- 39°) Procédé de dosage immunoenzymologique de protéines, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter des protéines présentes dans un fluide biologique en mettant en présence ledit fluide biologique avec le réactif de diagnostic selon la revendication 38 et en ce que la présence dudit réactif sous forme de complexe ou sous forme libre est révélée par une réaction colorimétrique appropriée.
- 20 40°) Procédé de dosage selon la revendication 39, caractérisé en ce que lesdites protéines sont des antigènes.
- 41°) Procédé de dosage selon la revendication 39, caractérisé en ce que lesdites protéines sont des anticorps.
- 42°) Trousse prête à l'emploi pour la mise en oeuvre d'un dosage enzymoimmunologique selon l'une
- 25 quelconque des revendications 39 à 41, caractérisée en ce qu'elle comprend outre les quantités appropriées de tampons et réactifs utiles pour la mise en oeuvre dudit dosage, des quantités appropriées du réactif selon la revendication 38.
- 43°) Procédé de criblage de banques d'ADNc ou d'acide nucléique génomique ou de sélection de clones recombinants, caractérisé en ce que l'on révèle la présence éventuelle d'une enzyme exportée ou sécrétée
- 30 à partir de clones de bactéries ou de cellules eucaryotes ayant éventuellement intégrées un plasmide, un phage, un cosmide ou un chromosome recombinant recherché comportant une séquence nucléique hybride selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 par une réaction colorimétrique ou une sélection sur un milieu de culture approprié.
- 44°) Procédé selon la revendication 43, caractérisé en ce que lorsque l'enzyme est la phosphatase alcaline,
- 35 on révèle la présence de l'enzyme exportée ou sécrétée à l'aide d'un substrat approprié de ladite enzyme.
- 45°) Procédé selon la revendication 43, caractérisé en ce que lorsque l'enzyme est la  $\beta$ -lactamase, on révèle la présence de l'enzyme exportée ou sécrétée à l'aide d'un milieu contenant de l'ampicilline.

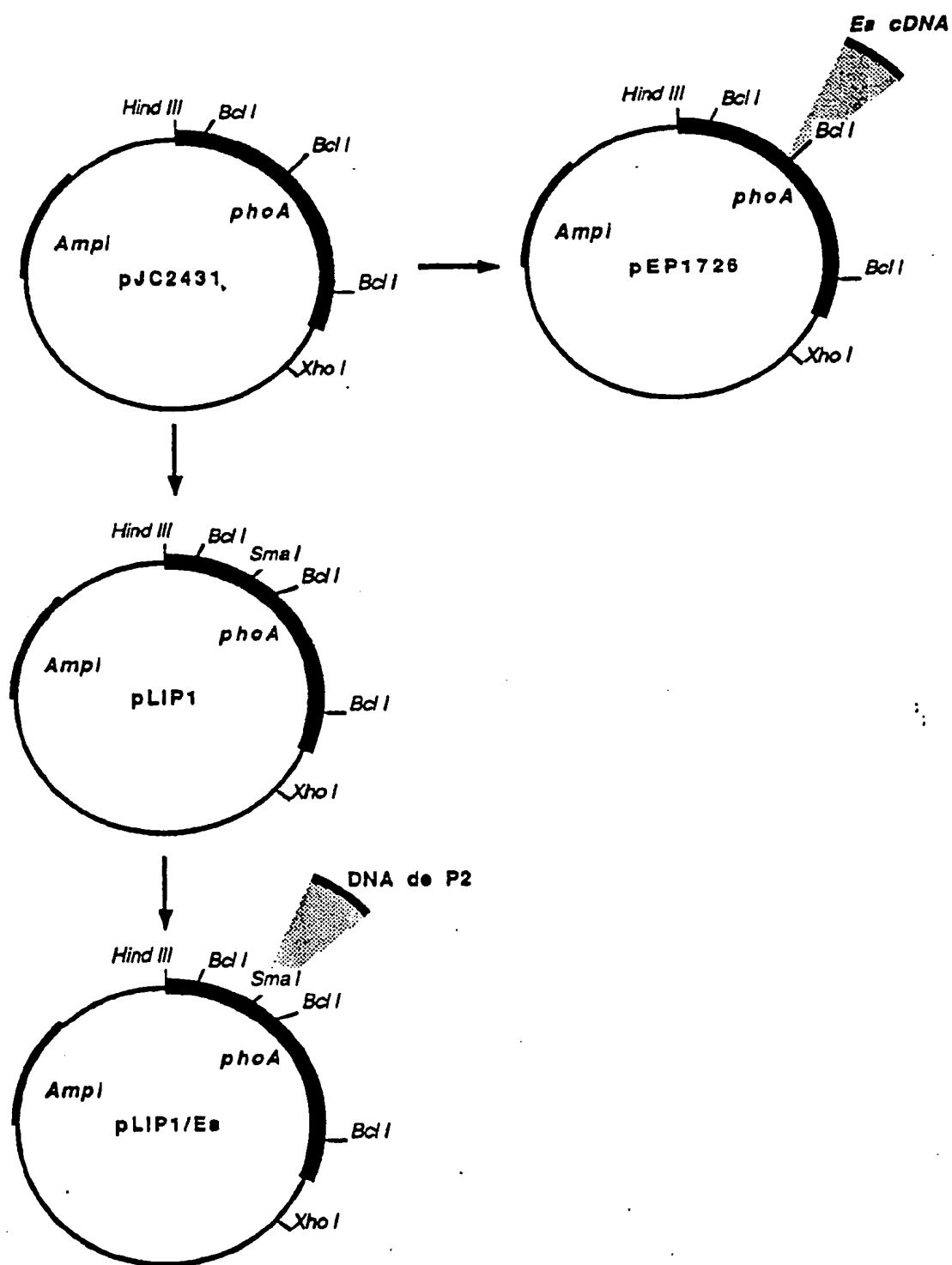
40

45

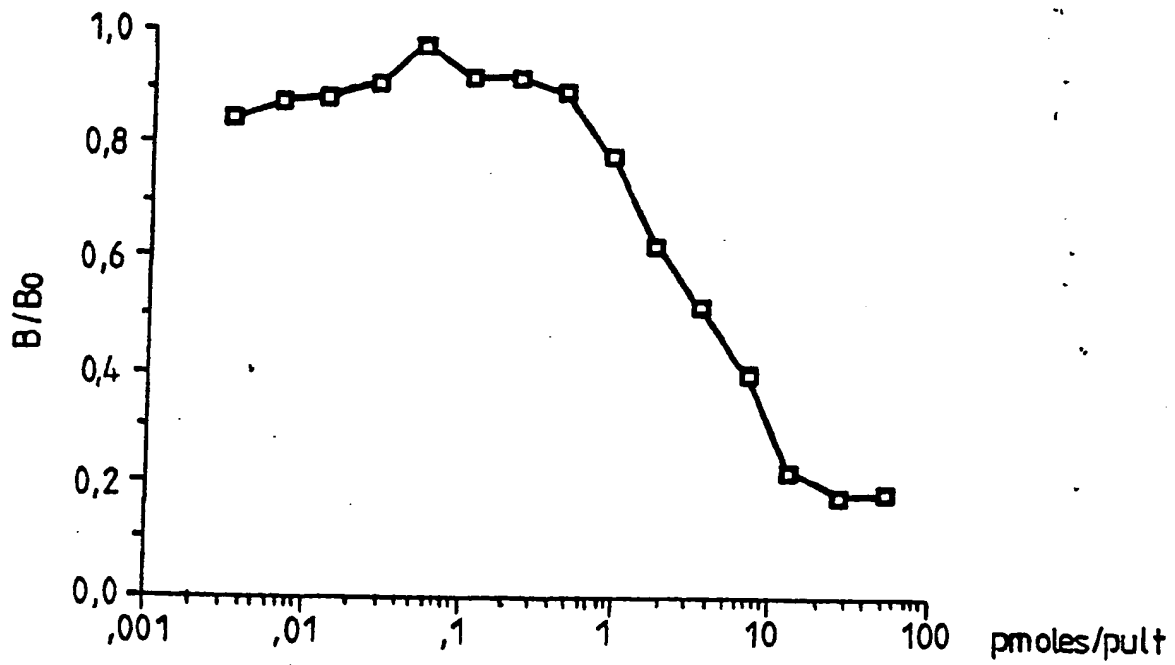
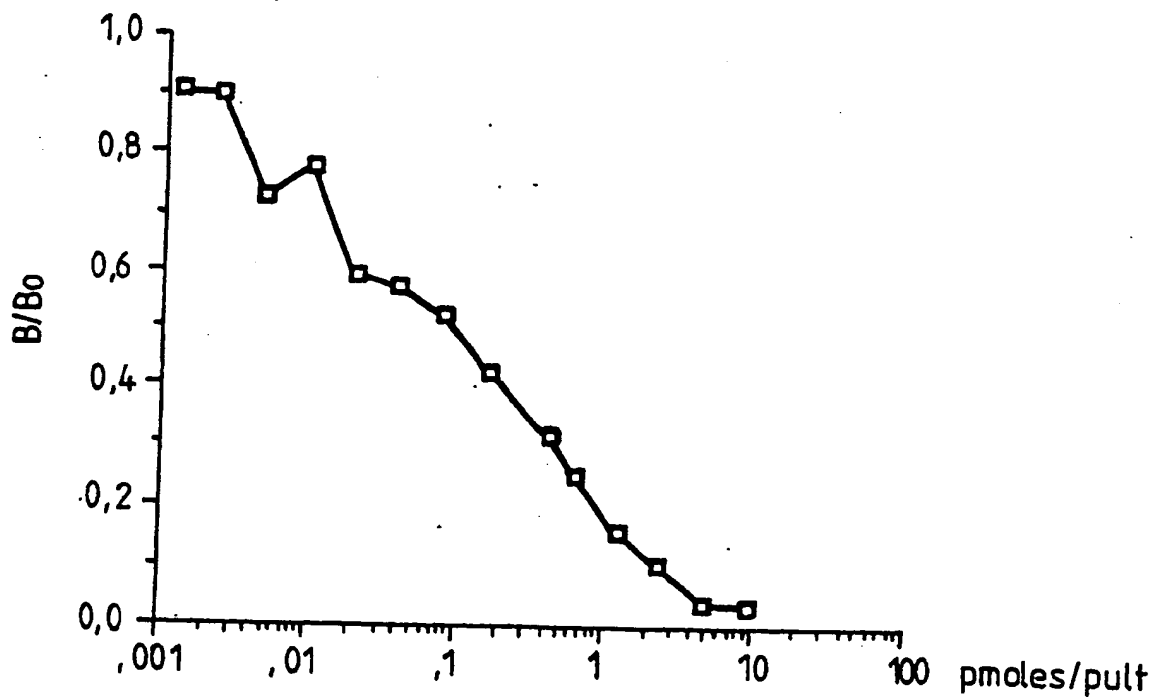
50

55





**FIG. 1**

FIG. 2FIG. 3



European Patent  
Office

## EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 90 40 1794

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
P,Y	EP-A-372352 (CHISSO CORPORATION) 13 June 1990 * the whole document * ---	1	C12N15/62 C12N1/21 C12N15/70 G01N G01N33/53
Y	EP-A-302381 (CHISSO CORPORATION) * the whole document * ---	1	
A	EP-A-316933 (CHISSO CORPORATION) * claims * ---	1	
D,Y	EP-A-242243 (INSTITUT PASTEUR/ CNRS) * the whole document * ---	1, 2, 5, 7, 8, 26, 27, 29, 37	
Y	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH vol. 149, no. 2, 16 December 1987, pages 607 - 614; LINDBLADH, C. ET AL.: "The design of a simple competitive ELISA using human proinsulin-alkaline phosphatase conjugates prepared by gene fusion." * the whole document * ---	1, 2, 5, 7, 8, 26, 27, 29, 37	
A	WO-A-8606742 (CALIFORNIA BIOTECHNOLOGY INC.) * claims * ---	1, 39, 41	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)  C12N
A	EP-A-23882 (SCHERING AG.) * page 1 * ---	1	
A	PROTEIN ENGINEERING. vol. 3, no. 2, 1989, EYNSHAM, OXFORD, ENG pages 139 - 143; DUCANCEL, F. et al.: "Direct expression in E.coli of a functionally active protein A-snake fusion protein." * the whole document * -----	1, 3, 15	
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 09 OCTOBER 1990	Examiner CHAMBONNET F.J.
<b>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</b> X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document  T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application I : document cited for other reasons  A : member of the same patent family, corresponding document			

1

EPO FORM 150 (02/92) (P0001)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**